

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19580058  
 研究課題名（和文） 昆虫の核DNAにおける「ニセ」のミトコンドリアDNAの解析と  
 利用技術の開発  
 研究課題名（英文） Analyses of insect mitochondrial DNA and its nuclear copies

## 研究代表者

村路 雅彦（MURAJI MASAHIKO）

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫-昆虫・植物間相互作用研究ユニット・上級研究員

研究者番号：20355746

研究成果の概要（和文）： 細胞小器官であるミトコンドリアの DNA (mtDNA) の塩基配列は、生物の進化や野外での集団動態を調べるための有効な分子マーカーであるが、核内の類似の塩基配列との識別が困難であるため、しばしば研究結果を誤る場合がある。本研究では多様な昆虫よりこの様なニセの mtDNA を単離し、その塩基配列と進化特性等を調べることにより、mtDNA を用いた解析の信頼性を高めるための技術開発を試みた。またそれを多様な昆虫に適用し有効性を調べた。

研究成果の概要（英文）： Nuclear copies (Numts) of the mitochondrial DNA (mtDNA) are the major factor that deteriorate the utility of mtDNA markers in phylogenetic and population studies of insects. In this study, Numts were isolated and sequenced using various insect species. By comparing the sequences between Numts and mtDNA, the structure, evolutionary history, and utility of Numts in insect studies were examined.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 昆虫 DNA 多型解析、昆虫分子進化

科研費の分科・細目： 農学、応用昆虫学

キーワード： 多型的 DNA マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫等のミトコンドリア DNA（以下 mtDNA と略）は、細胞当たりのコピー数が多く PCR による検出や解析が容易であること、遺伝的組換えがないこと、比較的短い分子内に進化速度が異なる様々な領域が存在

することなどから、種内や種間における遺伝的多様性、集団構造、系統関係などを解析するための有効な遺伝マーカーであると考えられている。これらの解析は、多くの機材や費用、高度な技術などを必要としないことから、昆虫を対象とする様々な研究分野に幅広く適用されている。

一方最近では、核の DNA 中に mtDNA と酷似した塩基配列が存在する例が報告されつつある。これは核 DNA にコピーされた mtDNA という意味で Numts (=Nuclear mitochondrial DNA) と呼ばれている。Numts の遺伝様式や進化特性は、核外遺伝子である mtDNA とは大きく異なるが、両方で塩基配列が共通していることが多く、mtDNA を対象とする PCR で Numts が増幅されてくる場合がある。本課題の予備実験では、Numts と mtDNA を区別せずに分子系統解析をおこなうと、遺伝的にかけ離れた集団が近縁のものとしてグルーピングされたり、遺伝的に均一な集団が 2 グループに分割されるなど、不正な結果が得られる。しかし、これまでの mtDNA マーカーを用いた研究では、Numts の存在を考慮した例は少なく、解析結果に疑念の余地が残るものもある。とくに日本の応用昆虫分野では、Numts に対する認識は低く、その可能性を排除したうえで実施された mtDNA マーカー利用研究はほぼ皆無である。

mtDNA を利用し、遺伝マーカーとして様々な分野で有効に活用するためには、Numts の特性を解明し、mtDNA と区別するための方法を開発する必要がある。また、Numts は mtDNA とほぼ同様な方法で容易に検出できるため、新たな核 DNA マーカーとして積極的に利用できる可能性もある。これらの実用的な面に加え、Numts はこれまで詳細が明らかでなかった核と核外遺伝子間での DNA 転移に関する研究モデルともなりうる。しかし昆虫の Numts に関する知見は、今のところきわめて断片的であり、どの程度普遍的な現象であるのかさえ明らかではない。これまでの研究は、特異性の低い PCR で偶発的に検出された偽遺伝子を解析したものが多く、核内における Numts の位置や周辺領域の塩基配列等は不明である。

## 2. 研究の目的

本課題では、昆虫を対象とする様々な研究分野で広く利用できる遺伝マーカーを開発するための一環として、核 DNA 内にコピーされた「ニセ」の mtDNA (= Numts) の解析を実施する。この DNA は、多くの分野で用いられている mtDNA マーカーの有効性と解析結果の信頼性を大きく低下させる重要な要因であるが、その詳細はほとんど明らかではない。本課題では、まず幅広い分類群の昆虫より本 DNA の検出を試み、その構造、分子進化および機能などに関する基礎的な解析を行う。それらの結果をもとに、mtDNA の特異的検出法など mtDNA マーカー利用研究の信頼性を改善するための技術について検討するとともに、それを多様な昆虫類に適

用し有用性を確認する。

## 3. 研究の方法

### (1) 昆虫サンプルの収集と DNA の精製・保存

多様な昆虫について多くの地域個体群を採集し、個体毎に DNA を精製・保存する。主要種については、細胞質分画からの mtDNA の抽出と交配実験における親子世代の DNA 抽出を実施する。

### (2) 昆虫の Numts の検出と塩基配列の解析

① PCR 等による Numts の単離：mtDNA の様々な部位に対応する混合プライマーを用いた PCR により、単一の個体より多様な mtDNA 類似断片を増幅・クローン化し、塩基配列を調べる。また一部についてはランダムなゲノム DNA 断片より mtDNA 類似塩基配列を有するものを探索する。

② Numts に特異的な分子特性等の探索：上記の塩基配列より mtDNA として不自然な挿入・欠失や 2 次構造などを示すものを特定する。また主要種では細胞質分画より得られた真正の mtDNA 塩基配列を調べ、これとの比較により Numts の特定と Numts に特異的な分子特性を明らかにする。

③ Numts とその周辺領域の塩基配列の解析：上記の解析で明らかとなった Numts に特有の分子特性に対応する PCR プライマーを作成し、既存の多様なプライマーとの組み合わせによる増幅産物の塩基配列を調べる。また restriction site PCR などにより Numts 周辺の未知領域の塩基配列を調べる。

### (3) Numts の起源と分子進化に関する解析

主要な昆虫種の多数の地理的個体群を用いて mtDNA と Numts の塩基配列による分子系統解析を実施し、mtDNA から核への DNA の転移の時期や頻度等を明らかにする。また塩基置換や遺伝的組換え、重複等の分子進化特性も調べる。

### (4) Numts および mtDNA の特異的検出法についての検討と多様な昆虫への適用

Numts と mtDNA の塩基配列および分子進化特性をもとに、それぞれの DNA を特異的に増幅するための方法について検討する。またそれらを各種昆虫の野外集団の解析に適用し有用性を検証する。

## 4. 研究成果

### (1) 多様な昆虫からの Numts の検出

鱗翅目、双翅目、半翅目、鞘翅目、直翅目、ゴキブリ目に属する各種昆虫について混合プライマーを用いたPCRを行ったところ、ミバエ、イナゴ、アメンボ、ヒメハナカメムシ、カミキリムシでmtDNAから核のDNAへ転移したと考えられるDNA断片(Numts)が検出された。ユニバーサルプライマーを用いた方法では、乾燥標本や死体などから抽出した劣化したDNA試料を用いた場合に高頻度でNumtsが増幅される傾向があり、このような試料の取り扱いには十分注意が必要である事が示された。

## (2) Numts の塩基配列と分子進化の特性

Restriction site PCR などにより Numts 周辺部の塩基配列を調べたもののうちミバエでは、ゲノム DNA 上に mtDNA の偽遺伝子とレトロポゾンなど可動遺伝子に特有の酵素遺伝子が近接して存在しており、Numts の形成、すなわち mtDNA から核 DNA への DNA 転移に関し、それらの遺伝子が関与している可能性が伺われた。またハナカメムシ類では、Numts の塩基配列は真正の mtDNA に極めて酷似しているにも関わらず、その大きさは数百塩基対程度であり、Numts は形成後の分子進化過程において急速に断片化した事が示唆された。

コセアカアメンボでは、全長約 6kb の Numts を特定することができた。これはこの時点で動物の Numts データベース等で公開されていたものの中で最も長いものであった。ここでは本種の Numts の分子特性を明らかにするため、産地の異なる 2 系統を用いて真正の mtDNA の全塩基配列約 15kb を調べ、両者の間で塩基配列の比較をおこなった。その結果、本種の Numts には mtDNA の COIII から cytb までのタンパク質をコードする遺伝子 7 個と tRNA 遺伝子 9 個に対応する偽遺伝子が含まれている事が明かとなった。このほか本種の Numts には MITES と呼ばれるトランスポゾン(可動遺伝子の一種)の挿入(2か所)や遺伝子断片の重複など(1か所)、mtDNA にはない特殊な変異が認められた。しかし、塩基組成は Numts と真正 mtDNA ではほとんど同じであること、タンパク質コード領域の塩基置換は 3rd ポジションに集中しており、また挿入・欠失などの変異もごく一部に限られるなど、Numts は大半の部分で mtDNA としての特性を保有しており、塩基配列のみにて両者を識別することは非常に困難であることが伺われた。

また本種の多くの地理的系統と近縁種について、Numts の cytb 偽遺伝子と真正 mtDNA の cytb 遺伝子の塩基配列を調べ分子系統解析をおこなった。その結果、本種の Numts は

本種が近縁他種から分化したあとに様々な地域集団に遺伝的分岐する以前の段階で、真正の mtDNA から転移・形成され独自に分子進化した事が明かとなった。このことはある生物種の真正 mtDNA 塩基配列にもとづく PCR プライマーを近縁他種に適用した場合には、必ずしもその種の真正 mtDNA を増幅できるとは限らないことを示している。この分子系統解析では、Numts と真正 mtDNA はそれぞれ独自のクレードを形成したが、遺伝的多様性は真正 mtDNA の方が大きく、両者の間で分子進化速度に違いが認められた。なおショウジョウバエの mtDNA 塩基配列にもとづくユニバーサルプライマーであって、Numts と真正 mtDNA で相違を示さない部位に対応するものを用いて、各種地理的集団の分子系統解析をおこなったところ、真正の mtDNA にもとづく解析結果や、地域の地史的特性から予測される遺伝的変異パターンとは大きくかけ離れた結果が得られた。これはそのようなプライマーでは、特定の地理的系統や個体では Numts が増幅され、他のものでは真正 mtDNA が増幅されるなどの現象によるものであった。もし単一の PCR 産物中に 2 種の DNA が混在する場合には、塩基配列解析時の電気泳動パターンから、容易に Numts の混在を疑うことが可能であるが、本種の様な場合にはそれが非常に困難であり、誤った結果を招く危険性が高いといえる。

## (3) Numts と mtDNA の特異的検出とその応用

Numts の進化速度は真正 mtDNA より遅く、分子マーカーとしての感度はやや低い、mtDNA とは異なる新規マーカーとしての有用性がある。しかし Numts の大きさや挿入部位は、昆虫の種や Numts の種類などによって異なるため、多様な昆虫に適用できる汎用的な PCR プライマーの作成は困難である。そのため本 DNA を分子マーカーとして積極的に利用するためには昆虫種ごとに各 Numts に特異的なプライマーを開発する必要がある。コセアカアメンボでは、Numts 内の最上流域にこの DNA に特有の反復配列が存在する。この部位に特異的なプライマーを用いた解析では、この反復配列の反復数に地理的な変異があり、PCR 産物の電気泳動で簡単に違いを検出できることが明かとなった。今後同様な分子マーカーの開発を試みる予定である。なおこの反復数が異なる系統間で交配実験を行い、親子間で PCR 産物の大きさを比較したところ、この DNA は母性遺伝せず、核 DNA として遺伝していることが確認できた。

一方、mtDNA をターゲットとする解析において、Numts の混入により不正な研究結果がもたらされることを防ぐためには、昆虫細胞から核を除去し、ミトコンドリアのみに由

来する DNA を試料として用いる事が最も有効である。しかしそのためには生きた昆虫を試料として用いる必要があること、高額な資材や多くの労力が必要であり、多数個体の解析に適さないなどの問題がある。これらの解決法として、当面は個体毎に多くの長い mtDNA 断片を増幅し、各断片の塩基配列を用いた予備的な解析結果の整合性を検証した上で、それらを結合させたデータを使用することが有効であると考えられた。Numts は分子進化の過程で断片化しやすく、しかも mtDNA とは異なる進化パターンを持つことから、複数の長い mtDNA 領域の系統進化のパターンを比較し、得られた結果が一致すれば、それらは mtDNA を反映しているとみなして差し支えないと考えられる。この方法はホタル類、トンボ類、カミキリ類、アメンボ類などでは有効であったが、コメツキムシ類では DNA 断片毎の予備解析結果の一部で不整合がみられ、この昆虫では予想に反する長さの Numts が存在することが示唆された。また本解析の結果、トンボ類では新種に相当する新しい地理的集団が検出され、ホタル類では微小地域毎に個体群が区分されていること、アメンボ類では系統進化と日本列島の地史が密接にリンクしていることが解明されるなど、本手法を用いた解析の有効性が示された。

#### (4) 本研究のインパクト等について

本研究は、これまで限られたグループの昆虫の mtDNA 多型研究の副産物として、断片的な知見しか得られていなかった Numts を多様な昆虫から検出し、それが普遍的な現象であることを明らかにするとともに、その構造と進化特性を解明したはじめての試みである。本研究の波及効果は大きく、これにより Numts が mtDNA マーカーの有用性を左右する極めて重要な要因である事が明らかとなり、今後安易な mtDNA マーカーの利用が制限されるとともに、過去に実施された研究結果の再検討が促進されると考えられる。Numts の存在を考慮しないまま膨大な量の mtDNA 多型関連のデータが蓄積されつつある今日において、本研究が科学的に意味のある DNA 多型利用研究を促進するために果たす役割は大きい。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Muraji M., Y. Hirai, T. Akino, S. Wakamura, H. Yasui, N. Arakaki, A. Nagayama, T. Ando, S. Tanizaki and Y. Hohama (2010) Relationship among local populations of the white grub beetle,

*Dasylepida ishigakiensis* (Coleoptera: Scarabaeidae), detected by phylogenetic analysis based on the mitochondrial DNA sequence. Applied Entomology and Zoology (日本応用動物昆虫学会英文誌)、査読有、45 巻、291–298 予定 (印刷中) .

Nakahara, S. and M. Muraji (2010) PCR-RFLP analysis of *Bactrocera dorsalis* (Tephritidae; Diptera) complex species collected in and around the Ryukyu Islands of Japan using the mitochondrial A-T rich control region. Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan (植物防疫所調査研究報告)、査読有、46 巻、17–23.

Muraji, M. and S. Nakahara, T. Ishida, K. Minoura, I. Miyazaki and T. Kohama (2008) The Philippines is a possible source of the *Bactrocera dorsalis* complex species (Diptera, Tephritidae) occasionally flown into the Ryukyu Islands of Japan; analyses of the mitochondrial DNA. Applied Entomology and Zoology (日本応用動物昆虫学会英文誌)、査読有、43 巻、609–615

Nakahara, S. and M. Muraji (2008) Phylogenetic analyses of *Bactrocera* fruit flies (Diptera: Tephritidae) based on nucleotide sequences of the mitochondrial DNA. Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan (植物防疫所調査研究報告)、査読有、44 巻、1–12.

Nakahara, S., Y. Kobashigawa and M. Muraji (2008) Genetic variations among and within populations of the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera; Tephritidae), detected by PCR-RFLP of the mitochondrial control region. Applied Entomology and Zoology (日本応用動物昆虫学会英文誌)、査読有、43 巻、457–465.

Muraji, M., N. Arakaki, S. Ohno and Y. Hirai (2008) Genetic variation of the green chafer, *Anomala albopilosa* (Hope) (Coleoptera: Scarabaeidae), in the Ryukyu Islands of Japan detected by mitochondrial DNA sequences. Applied Entomology and Zoology (日本応用動物昆虫学会英文誌)、査読有、43 巻、299–306.

Muraji, M., Y. Hirai, T. Akino, S. Wakamura and N. Arakaki (2008) Genetic divergence among populations of the white grub beetle, *Dasylepida ishigakiensis* (Coleoptera: Scarabaeidae), distributed in the southern part of the Ryukyu Islands of Japan, detected from the mitochondrial DNA sequences. Applied Entomology and Zoology (日本応用動物昆虫学会英文誌)、査読有、43 巻、287–292.

村路雅彦・新垣則雄・大野豪・平井剛夫 (2008) 南西諸島と周辺域におけるアオドウガネの遺伝的変異と地理的分布. *Saikaku Tsushin*, 査読無、17 巻、51-57.

〔学会発表〕 (計 3 件)

村路雅彦, 立石剣 (2008) 東日本におけるプラタナスグンバイの遺伝的変異 (予報). 第 52 回日本応用動物昆虫学会大会、第 52 回日本応用動物昆虫学会大会、平成 20 年 3 月 27 日、宇都宮大学。

中原重仁, 宮崎勲, 小濱継雄, 村路雅彦 (2008) 沖縄県に飛来するミカンコミバエ種群の遺伝的変異 フィリピンからの直接飛来の可能性について. 第 52 回日本応用動物昆虫学会、第 52 回日本応用動物昆虫学会大会、平成 20 年 3 月 28 日、宇都宮大学。

村路雅彦, 平井剛夫, 秋野順治, 若村定男, 新垣則雄 (2008) 先島諸島におけるケブカアカチャコガネの遺伝的変異. 第 52 回日本応用動物昆虫学会大会、平成 20 年 3 月 28 日、宇都宮大学。

以上

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村路 雅彦 (MURAJI MASAHIKO)  
独立行政法人農業生物資源研究所  
昆虫-昆虫・植物間相互作用研究ユニット  
上級研究員  
研究者番号：20355746

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：